

АНТИГЕННОЕ СРОДСТВО ВИДОВ РОДА *DIPHYLLOBOTHRIUM*
(CESTOIDEA, DIPHYLLOBOTHRIIDAE),
РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ КАРЕЛИИ

Е. Г. Сергеева

Лаборатория гельминтологии АН СССР, Москва

Проведено сравнительно-серологическое изучение 4 видов цестод рода *Diphyllobothrium*: *D. latum* L., 1758, *D. dendriticum* (Nitzsch, 1824;), *D. ditremum* (Creplin, 1825), *D. vogeli* Kuhlowl, 1953. Описана сравнительная результативность различных схем иммунизации кроликов для получения антисывороток с высоким титром. Дана количественная оценка степени серологического сродства между 4 исследованными видами цестод.

По мере развития иммуносистематики становится все более очевидным, что использование серологических данных полезно не только для контроля систематических построений, основанных на использовании классических таксономических критериев. В ряде случаев иммунологические методы позволяют решать такие вопросы систематики, на которые при использовании классических критериев точный ответ получить невозможно. Так, в частности, иммунологические методы позволяют проводить количественную оценку степени антигенного сродства между родственными таксонами одного ранга, что по существу адекватно установлению степени их филогенетической близости. Очевидно, что количественные данные по степени сходства-различия таксонов чрезвычайно полезны для реконструкции филогенетических взаимоотношений и построения естественной системы любой группы организмов. Уже в 1928 г. Ландштайнер высказывал убеждение, что филогенетическое древо животного мира можно построить только с учетом данных сравнительной серологии (Landsteiner, 1928). И тем не менее иммунологические методы до настоящего времени очень мало используются в работах по систематике и филогении гельминтов.

В частности, исследования по иммуносистематике в пределах отряда Pseudophyllidea ограничены работами Кравцова (1968), Кравцова и Петровой (1977). Этими авторами проведено сравнительно-серологическое изучение цестод 4 родов (*Diphyllobothrium*, *Spirometra*, *Taeniarhynchus* и *Taenia*). При этом установлено наличие антигенов, общих для всех исследованных цестод, а также антигенов, характерных только для представителей сем. *Diphyllobothriidae*. В пределах этого семейства отмечены серологические отличия между исследованными формами рода *Diphyllobothrium*, с одной стороны, и представителем рода *Spirometra* (*S. erinacei-europaea*) — с другой. Возможность видовой иммунохимической диагностики и выявления серологического сродства между видами одного рода до настоящего времени у представителей класса Cestoidea не проверялась.

Целью данной работы явилась попытка исследовать систематические взаимоотношения разных видов цестод рода *Diphyllobothrium* на основе их видовой иммунологической специфичности. Для проведения такого рода исследований необходимы высокотитражные иммунные сыворотки. В связи с этим встала за-

дача отработать оптимальную схему иммунизации кроликов экстрактами из половозрелых форм дифиллоботриид путем использования разных схем и методов введения антигена.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнялась в 1979 и 1980 гг. на территории Медвежьегорского р-на КАССР. Для получения антигенов цестод использовали следующий материал: стробилы *Diphyllbothrium latum* — от экспериментального заражения собак; стробилы *D. ditremum* и *D. dendriticum* — от спонтанно зараженных чаек (*Larus canus*, *L. fuscus*, *L. argentatus*) и крачек (*Sterna hirundo*); стробилы *D. vogeli* — от экспериментально зараженных золотистых хомячков (*Mesocricetus auratus*) и птенцов чаек.

Антигены для иммунизации приготавливали следующим образом. После многократной промывки цестод в дистиллированной воде определяли их вес, а затем растирали в гомогенизаторе на холоде до образования однородной суспензии в физиологическом растворе в соотношении 1 : 10. После экстрагирования при комнатной температуре отделяли осадок путем центрифугирования при 5 тыс. об./мин в течение 20 мин. Надосадок фильтровали через бумажный фильтр, а затем стерилизовали на фильтре «Миллипор» с диаметром поры 0.22 мкм. В качестве консерванта использовали мертиолат в конечном разведении 1 : 10 000.

Для дозировки антигена, вводимого при иммунизации кроликам, в фильтрате определяли белок по методу Лоури. Готовые антигены хранились в холодильнике при +4 °С. Антиген вводили из расчета 10 мг белка, определенного по Лоури, на 2 кг веса кролика.

Первоочередной задачей сравнительно-серологических исследований является получение антисыворотки, имеющей достаточно высокий титр. В качестве титра при этом рассматривается то минимальное количество белка антигена, которое в состоянии сформировать отчетливое кольцо специфического преципитата.

Титрование сывороток проводили с помощью постановки реакции кольце-преципитации с гомологичным антигеном. Реакцию ставили в микропробирках, куда сначала заливали равный объем антисыворотки, разведенной 1 : 2 или 1 : 4. Затем на сыворотку пастеровской пипеткой осторожно наслаивали примерно такой же объем соответствующего разведения антигена. При этом очень важно, чтобы между жидкостями сохранилась четкая граница раздела, по которой, в случае соответствия антигена антителам иммунной сыворотки, происходит их соединение. В результате на границе между слоями этих двух жидкостей появляется видимое невооруженным глазом белое кольцо преципитации.

Для определения оптимальных сроков и способов введения антигена были использованы различные схемы иммунизации кроликов. Оптимальные результаты получены в следующем варианте. Кролику внутримышечно с адьювантом было введено 9.8 мг чужеродного белка. На 8-й день внутрибрюшинно добавлено 2.5 мг и на 52-й день внутривенно — 0.7 мг белка. Титрование антисыворотки на 53-й день проявило титр 0.009 мг белка.

Таким образом, применение адьюванта при внутримышечном введении антигена с дальнейшими внутрибрюшинными и внутривенными введениями позволяет получить антисыворотку с достаточно высоким титром в минимальные сроки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После определения титра антисывороток были поставлены реакции кольце-преципитации с гомологичными антигенами для выявления антигенного родства изучаемых видов гельминтов. Результаты приведены в таблице.

Как и следовало ожидать, наименьшее количество антигена требуется для реакции кольце-преципитации в гомологичных вариантах. Это количество варьировало от 0.045 мг (*D. vogeli*) до 0.059 мг (*D. ditremum*). Существенно отметить, что во всех случаях постановки гетерологичных реакций (антиген одного вида с антисывороткой к другому виду), количество белка антигена, необходимое

Минимальное количество белка антигена, необходимое для реакции кольцепреципитации с гомологичными и гетерологичными антисыворотками

Антисыворотка	Антиген			
	<i>D. vogeli</i>	<i>D. dendriticum</i>	<i>D. ditremum</i>	<i>D. latum</i>
<i>D. vogeli</i>	0.0045	0.225	0.118	
<i>D. dendriticum</i>	0.250	0.007	0.059	
<i>D. ditremum</i>	0.250	0.450	0.059	
<i>D. latum</i>	*	*	*	0.015

Примечание. Звездочка — кольцо преципитации не образуется.

для реакции кольцепреципитации, было всегда значительно больше, чем в случаях проведения гомологичных реакций. Эти данные показывают, что между 4 исследованными видами имеются заметные различия по антигенному составу, и являются дополнительным подтверждением видовой самостоятельности всех исследованных форм лентецов.

Из таблицы видно также, что количество белка антигена, вызывающего образование колец преципитации в случаях гетерологичных реакций, существенно отличается в перекрестных вариантах у различных сравниваемых пар видов.

Известно, что, чем больше серологическое сродство между двумя сравниваемыми видами, тем меньшее количество антигена требуется для получения положительного результата в реакции кольцепреципитации. Основываясь на этом универсальном правиле, можно количественно оценить степень серологического сродства между 4 исследованными видами лентецов. Для такой количественной оценки целесообразно рассчитать относительные показатели, характеризующие отношение количества белка антигена, необходимого для реакции преципитации в гомологичных вариантах, к таковому в случаях перекрестных (гетерологичных) реакций с антисыворотками к другим видам. Рассчитанные таким образом показатели представлены на рисунке.

Из рисунка видно, что вид *D. latum* занимает обособленное место в пределах рода. При постановке перекрестных опытов с 3 остальными видами рода в реакции кольцепреципитации образование преципитата не наблюдалось ни в одном из вариантов экспериментов. Это показывает, что по составу антигенных компонентов данный вид максимально далек от всех исследованных представителей рода и соответственно имеет с ними минимальные родственные связи.

Судя по иммунологическим показателям, наиболее тесное родство имеется между видами *D. dendriticum* и *D. ditremum*. Перекрестные реакции между этими двумя видами показали наличие положительных реакций кольцепреципитации при использовании минимальных количеств белка антигена и сывороточных иммуноглобулинов (7.6—8.4). Следует отметить, что по всему комплексу таксономических признаков, обычно используемых в систематике цестод, эти два вида также чрезвычайно сходны. Именно поэтому видовая самостоятельность данных видов долгое время вызвала сомнения и была объектом специальных дискуссий (Bylund, 1975). К этой группе тяготеет и вид *D. vogeli*, однако положение его, судя по использованному показателю, достаточно обособленно. При этом по степени антигенного сродства этот вид стоит несколько ближе к виду *D. ditremum* (4.2—26), чем к *D. dendriticum* (36—50).

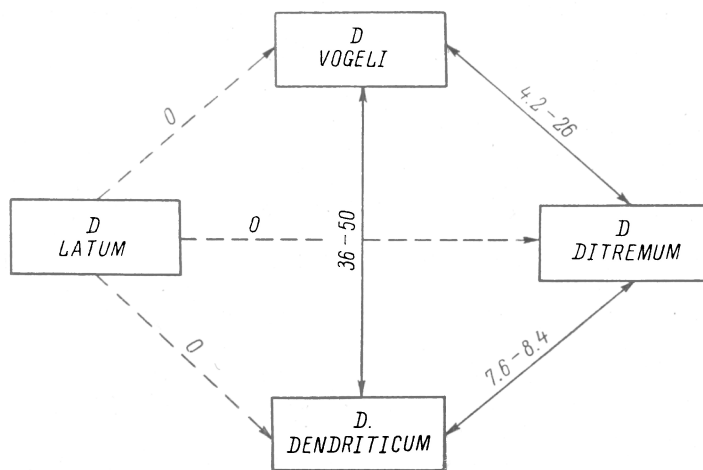
В последние годы опубликован ряд обобщающих работ, подводящих итоги изучения видового состава и эколого-географических особенностей цестод рода *Dipyllobothrium* (Фрезе, 1977; Розенберг, 1977; Сердюков, 1979; Bylund, 1975; Bonsdorff, 1977, и др.). Из этих работ можно видеть, что проблемы эволюции и филогенетических взаимоотношений видов данного рода, обитающих на евроазиатском континенте, до настоящего времени специально не рассматривались. Таким образом, представленные выше данные по степени антигенного сродства лентецов фауны Европы не могут быть сопоставлены с какими-либо построени-

ями по филогении рода, основанными на использовании иных критериев реконструкции родственных отношений.

Однако, используя литературные материалы, а также фактические данные, полученные в местах проведения данной работы,¹ представляется целесообразным сопоставить данные по серологическому родству с некоторыми особенностями жизненных циклов исследованных видов, и, в частности, с особенностями их экологической изоляции при паразитировании в дополнительных и окончательных хозяевах.

Прежде всего нетрудно видеть, что наиболее близкие по антигенному составу виды — *D. dendriticum* и *D. ditremum* — на последних фазах жизненного цикла характеризуются минимальной степенью экологической изоляции.

Круг их дополнительных хозяев в основном состоит из типичных представителей арктического пресноводного ихтиофаунистического комплекса (характеристика и состав фаунистических комплексов рыб в трактовке Никольского,



Относительные показатели степени антигенного родства 4 изученных видов цестод рода *Diphyllbothrium*.

1953 и Яковлева, 1964). По систематическому положению большая часть рыб-хозяев этих видов относится к сем. Salmonidae. В водоемах Европы круг хозяев *D. dendriticum* включает 13 видов рыб, *D. ditremum* — 10 видов, из этого числа у 8 видов рыб зарегистрированы плероцеркоиды обоих видов цестод (Розенберг, 1977).

Можно отметить также, что в ряде водоемов зарегистрированы находки плероцеркоидов обоих видов в одной особи хозяина (у видов из родов *Coregonus*, *Salmo*, *Salvelinus*). У тех видов рыб, которые зарегистрированы как хозяева только одного из рассматриваемых видов цестод, как правило, отмечены единичные, случайные находки этих паразитов.

Сопоставление качественных особенностей среды I порядка, используемой видами *D. dendriticum*, *D. ditremum* на рассматриваемой фазе жизненного цикла, показывает, что оба вида распределены в общей экологической нише, отграниченной рамками указанного фаунистического комплекса рыб. Наличие экологической изоляции между этими видами может быть установлено только при сопоставлении количественных показателей зараженности отдельных видов хозяев. Так, в исследованных нами очагах максимальные показатели экстенсивности инвазии *D. dendriticum* отмечены у сига (*Coregonus lavaretus*), тогда как у других хозяев (роды *Salmo*, *Salvelinus*, *Thymalus*) были найдены единичные особи этого паразита. Облигатным хозяином *D. ditremum* в этих же

¹ На территории Медвежьегорского р-на КАССР Карельским экспедиционным отрядом Лаборатории гельминтологии АН СССР в 1978—1981 гг. обследовано свыше 12 000 рыб — дополнительных хозяев лентецов 4 видов и около 1000 экз. их окончательных хозяев — птиц и млекопитающих. При обсуждении используются журналы вскрытий указанных трех классов позвоночных.

водоемах является ряпушка (*Coregonus albula*), у других видов лососевых рыб, включая сига, этот паразит встречается крайне редко.

Таким образом, степень экологической дивергенции рассматриваемых видов на данной фазе жизненного цикла очень невелика и межвидовая изоляция имеет относительный характер.

Данные о круге хозяев этих видов на следующей фазе жизненного цикла гораздо менее определены. Дифференциальная диагностика стробил *D. dendriticum* и *D. ditremum* была разработана сравнительно недавно. Более ранние находки диагностировались по морфологическим признакам, большинство из которых не отражало реальных видовых морфологических различий между этими видами (Фрезе, 1977; Сердюков, 1979). Поэтому использовать эти данные можно только с большой осторожностью. Судя по литературным данным, вид *D. dendriticum* в Европе распространен в основном у чайковых птиц, тогда как *D. ditremum* тяготеет к птицам из родов *Gavia*, *Phalacrocorax*, *Ardea* и некоторых других. Однако в исследованных нами очагах наличие такой четкой гостальной дивергенции не подтвердилось. Оба вида были найдены только в птицах сем. Laridae, причем часто отмечались совместные находки стробил *D. dendriticum* и *D. ditremum* в одной птице (у видов *Larus canus*, *Larus fuscus*, *Sterna hirundo*). При этом показатели экстенс-интенсивности инвазии отдельных видов хозяев каждым из рассматриваемых видов цестод были сходны, что не позволяет говорить даже о наличии относительной экологической изоляции этих видов за счет образования облигатных паразито-хозяинных систем с разными видами птиц в пределах общего круга хозяев.

Таким образом, виды *D. dendriticum* и *D. ditremum* две из трех паразитических фаз своего жизненного цикла проходят в одном и том же круге условий среды I порядка: в группах дополнительных и окончательных хозяев, объединенных общностью эколого-географического генезиса и близких по своему филогенетическому происхождению. Естественно ожидать, что степень видовой дивергенции в такой эволюционной ситуации, скорее всего, будет невелика. Именно это и показывают литературные данные, отмечающие значительное сходство рассматриваемых видов по широкому кругу систематических признаков. В результате, как уже отмечалось, видовая самостоятельность их долгое время вызывала сомнение. Следствием (и подтверждением) малой степени видовой дивергенции этих видов является и сходство антигенного состава стробил этих цестод, которое было зарегистрировано в данной работе.

Как отмечалось выше, к этой паре видов по серологическим показателям тяготеет вид *D. vogeli*, который по антигенному составу стоит несколько ближе к виду *D. ditremum*. В литературе нет данных о круге реальных окончательных хозяев *D. vogeli*. Имеются только сведения о приживаемости этого вида в условиях эксперимента (Фрезе, 1977), однако они не позволяют оценить экологическую специфику этого вида в естественных условиях. В то же время анализ состава дополнительных хозяев *D. vogeli* показывает существенные отличия от *D. dendriticum* и *D. ditremum*. На этой фазе жизненного цикла для *D. vogeli* характерен чрезвычайно узкий круг хозяев (два вида рыб) и строгая специфичность к одной филогенетической ветви рыб — к отряду Gasterosteiformes. Этот вид практически не встречается у лососевых рыб — хозяев двух ранее рассмотренных видов. Можно предполагать, что экологическая изоляция этого вида на одной из паразитических фаз жизненного цикла в условиях среды I порядка, качественно отличающихся от таковых *D. dendriticum* и *D. ditremum*, причинно предопределила изменение антигенного спектра и уменьшение степени серологического родства *D. vogeli* с указанной парой видов.

Такое предположение хорошо подтверждается на примере вида *D. latum*. Хотя дополнительными хозяевами этого вида являются представители разных филогенетических ветвей класса рыб (щуковые, окуневые, карповые, тресковые), в фаунистическом плане они составляют достаточно монолитную и обособленную группу, являясь типичными компонентами бореального равнинного ихтиофаунистического комплекса. Именно у видов рыб из этого комплекса постоянно регистрируются высокие показатели экстенс-интенсивности инвазии плероцеркоидами *D. latum*. Нельзя говорить об абсолютной экологической изоляции данного вида в указанном комплексе, поскольку плеро-

церкоидов *D. latum* многократно регистрировали у рыб из других ихтиофаунистических комплексов, в первую очередь — из арктического пресноводного (лососевые, хариусовые). Однако крайне низкие показатели зараженности этих рыб определенно свидетельствует, что паразито-хозяйинные связи *D. latum* с представителями всех ихтиофаунистических комплексов, кроме бореально-равнинного, имеют случайный характер, и основной поток данной инвазии, хотя и относительно, но закономерно ограничивается рамками одного фаунистического комплекса.

Еще более четкая экологическая изоляция *D. latum* наблюдается на следующей фазе жизненного цикла. Как известно, этот вид является специфичным паразитом млекопитающих и даже в условиях эксперимента не приживается у птиц — облигатных окончательных хозяев трех рассмотренных ранее видов цестод.

Тем самым на рассматриваемой фазе жизненного цикла данным видом освоена специфическая, качественно отличающаяся экологическая ниша, за пределы которой он не выходит (абсолютная изоляция). Экологическая радиация в эту нишу других видов рода, из числа связанных с пресноводными биоценозами, также практически отсутствует (у млекопитающих отмечены только единичные находки вида *D. dendriticum*).

Таким образом, для вида *D. latum* характерно, с одной стороны, изолированное обитание в условиях среды I порядка, качественно отличающихся от таковых остальных видов рода, и, с другой — отсутствие серологического сродства с другими видами этого рода, обитающими на той же территории.

Обобщая изложенные выше данные, остановимся на некоторых общих моментах. Прежде всего отметим наличие четких иммунологических отличий между видами, обитающими в одних и тех же условиях среды I порядка и трудно дифференцируемых по всем признакам, обычно используемым в систематике цестод (*D. dendriticum* и *D. ditremum*). Это показывает ценность иммунологического критерия в работах, посвященных выявлению видовой самостоятельности и обоснованию валидности ранее описанных форм цестод. И, во-вторых, в пределах рассматриваемого рода можно отметить наличие определенной корреляции между особенностями экологической специализации видов и степенью их серологического сродства. Как уже говорилось, при обитании видов цестод в одинаковых (или близких) условиях среды I порядка иммунологические различия между ними, хотя и имеются, но они невелики.

В случае экологической специализации вида к качественно отличающимся условиям среды I порядка серологическое сродство его с остальными видами уменьшается. При этом, чем более специфична экология данного вида на каждой из паразитических фаз, чем большее число фаз захвачено экологической специализацией, тем меньше показатели серологического сродства специализированного вида с другими родственными видами.

Л и т е р а т у р а

- К р а в ц о в Э. Г. Иммунологические подходы к изучению систематики возбудителей дифиллоботриозов человека. — Автореф. канд. дис. М., 1968. 18 с.
- К р а в ц о в Э. Г., П е т р о в а В. М. Иммунологическая идентификация лентецов Карелии и Западной Сибири. — В кн.: Вопросы краевой инфекционной патологии. Л., 1977, с. 121—122.
- Н и к о л ь с к и й Г. В. О биологической специфике фаунистических комплексов и значение их анализа для зоогеографии. — В кн.: Очерки по общим вопросам ихтиологии. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1953, с. 65—76.
- Р о з е н б е р г А. И. Дифиллоботрииды и дифиллоботриозы, имеющие медико-ветеринарное значение. — Указатель отечественной и иностранной литературы 1958—1972. Петрозаводск. Карелия, 1977. 302 с.
- С е р д ь о в А. М. Дифиллоботрииды Западной Сибири. Новосибирск, Наука, 1979. 119 с.
- Ф р е з е В. И. Лентецы Европы (экспериментальное изучение полиморфизма). — Тр. ГЕЛАН, 1977, т. 27, с. 174—204.
- Я к о в л е в В. Н. История формирования фаунистических комплексов пресноводных рыб. — В кн.: Вопр. ихтиологии. Т. 4, вып. 1. 1964, с. 10—22.
- В y l u n d G. Delimitation and characterization of european *Diphyllbothrium* species. Department of Biology. Abo Akademi, 1975. 24 p.

- B o n s d o r f f v. B. Diphyllbothriasis in Man. Academic Press, London, N. Y., San Francisco, 1977. 189 p.
- L a n d s t e i n e r K. Cell antigens and individual specificity. — J. Immunol., 1928, vol. 15, N 6, p. 589—599.
-

ANTIGENIC AFFINITY BETWEEN SPECIES OF CESTODES OF THE GENUS
DIPHYLLOBOTHRUM (CESTOIDEA, DIPHYLLOBOTHRIDAE) DISTRIBUTED
IN KARELIA

E. G. Sergeeva

S U M M A R Y

Experiments on ringprecipitation reactions with homologous and heterologous antigens of four species of diphyllbothriids have shown that *D. dendriticum* and *D. ditremum* are in a more close antigenic affinity. In relation to the above two species *D. vogeli* is approximately at the same level. *D. latum* displayed no antigenic affinity with the above species that, apparently, is connected with its parasitism only in mammals.

Schemes of immunization of rabbits for obtaining antisera are given.
